

(12) PATENT
(19) AUSTRALIAN PATENT OFFICE

(11) Application No. AU 199730881 B2
(10) Patent No. 717543

(54) Title
Vehicle for the transport of molecular substances

(51)⁷ International Patent Classification(s)
C12N 015/87 C12N 015/86
A61K 048/00

(21) Application No: **199730881**

(22) Application Date: **1997.05.07**

(87) WIPO No: **WO97/43431**

(30) Priority Data

(31) Number	(32) Date	(33) Country
19618797	1996.05.10	DE

(43) Publication Date : **1997.12.05**

(43) Publication Journal Date : **1998.02.12**

(44) Accepted Journal Date : **2000.03.30**

(71) Applicant(s)
Wolf Bertling

(72) Inventor(s)
Wolf Bertling

(74) Agent/Attorney
GRIFFITH HACK,GPO Box 3125,BRISBANE QLD 4001

(56) Related Art
AU 94/78120
EP 259149
GB 2257431

OPI DATE 05/12/97 APPLN. ID 30881/97
AOJP DATE 12/02/98 PCT NUMBER PCT/DE97/00919



AU9730881

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/87, 15/86, A61K 48/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/43431
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97)	
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00919 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Mai 1997 (07.05.97) (30) Prioritätsdaten: 196 18 797.4 10. Mai 1996 (10.05.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nürnberger Strasse 71, D-91052 Erlangen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, JP, KR, MX, SG, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: VEHICLE FOR THE TRANSPORT OF MOLECULAR SUBSTANCES (54) Bezeichnung: VEHIKEL ZUM TRANSPORT VON MOLEKULARER SUBSTANZ (57) Abstract <p>The invention relates to a vehicle for the transport of molecular substances such as DNA, RNA, protein, PNA, pharmaceutical substances of lipophile and lipophobe character in eukaryotic cells comprising at least one capsomer derived from or originating from a virus that exhibits on its side a structure which interacts with the molecular substance so that the molecular substance can be bonded or become attached to the capsomer.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Vehikel zum Transport von molekularer Substanz wie DNA, RNA, Protein, PNA, Arzneistoffe lipophilen und lipophoben Charakters, in eukaryontische Zellen umfassend mindestens ein von einem Virus abgeleitetes oder stammendes Kapsomer, das an seiner einen Seite eine mit der molekularen Substanz in Wechselwirkungen tretende Struktur aufweist, so daß die molekulare Substanz an das Kapsomer bind- bzw. anlagerbar ist.</p>			

Vehicle for the transport of molecular substance

The invention relates to a vehicle for the transport of molecular substance, such as DNA, RNA, protein, PNA pharmaceuticals of lipophilic and lipophobic character,
5 into eukaryotic cells. The invention furthermore relates to a process for the preparation of the vehicle, its use and compositions of agents for applying or carrying out the invention.

Under certain conditions, eukaryotic cells absorb
10 DNA, proteins and other molecules. The absorption rate, however, is usually low. Additionally, the transport of the molecular substance is not predeterminable with respect to the nature of the cells and the cell compartment or the site in the intracellular region.

15 In order to improve, in particular, the absorption of DNA into eukaryotic cells, it is known to use viral vectors as vehicles for transport into the cell. The use of viral vectors is disadvantageous because in this case the cotransfection of viral genomes can occur.

20 It is furthermore disclosed in US 4,950,599 to lock molecular substance such as DNA into eukaryotic cells using empty virus capsids, in particular polyoma capsids. Even in this process cotransfection of viral genomes cannot be excluded. Additionally, molecules whose size
25 exceeds the internal volume of the polyoma capsid cannot be packed therein. Finally, synthetic preparation of polyoma capsids, which comes into consideration as one possibility of avoiding cotransfection, is extremely difficult and cost-intensive.

30 The object of the invention is to eliminate the disadvantages of the prior art, in particular to



indicate a vehicle for the transport of molecular substance into eukaryotic cells which can be used universally and can be prepared simply and in a cost-effective manner.

5 According to the present invention, there is provided a process for the preparation of a vehicle with molecular substance, such as DNA, RNA, protein, PNA, pharmaceuticals of lipophilic and lipophobic character, for transport into eukaryotic cells, comprising at least one capsomere
10 derived or originating from a virus, which capsomere is formed such that it is suitable for the construction of a capsid or a capsid-like structure and on one of its sides has a structure interacting with the molecular substance such that the molecular substance can be bound or added to
15 the capsomere, and where said one side of the capsomere after assembly is a constituent of the inside of the capsid or capsid-like structure, comprising the following steps:

20 i) synthesis, purification or isolation of the capsomere; and

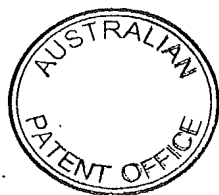
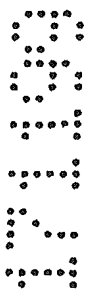
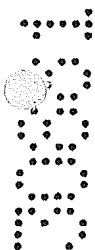
 ii) complexation of the molecular substance using the capsomere.

 The process according to the invention has the advantage that the vehicle can be synthetically prepared relatively simply. Cotransfection of viral genomes can
25 thus be avoided. Additionally, because of the provision of the structure interacting with the molecular substance, molecular substance of any size can be bound and locked into cells. To do this, the typical capsid form no longer
30 has to be maintained. Using a vehicle prepared by the process according to the invention, capsomeres of a different kind may also be formed. A particular advantage of the invention can be seen in that, with a vehicle



prepared by the process according to the invention,
depending on the formation of the at least one capsomere,
it is possible to transport the molecular substance
specifically into certain cells and/or to a prespecified
5 site in the intracellular region.

The capsomere is formed such that it is suitable for
the construction of a capsid or a capsid-like structure.
It is particularly advantageous if the capsomere
spontaneously forms capsids.



According to a further embodying feature of the invention, the capsomere is derived from the polyoma virus, it being possible to form it from the VP1 pentamer of the polyoma virus.

5

Alternatively, the capsomere can be obtained from "non-enveloped" viruses such as DNA-containing Papovaviridae, in particular polyoma viruses and the papilloma viruses, Iridoviridae, Adenoviridae, Parvoviridae or RNA-containing Picornaviridae, in particular polio viruses, Caliciviridae, Reoviridae and Birnaviridae, or derived therefrom. Depending on the type of molecular substance to be transported, it may also be advantageous to obtain the capsomere from the outer and/or inner coat of "enveloped" viruses such as DNA-containing Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae or RNA-containing Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendai viruses, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae and Filoviridae or to derive it therefrom.

The interactions are expediently lipophilic interactions and/or interactions which are based on covalent bonds, ionic bonds or hydrogen bridges. It is thus ensured that the molecular substance on transporting into the cell remains safely bound or adhered to the vehicle, but after transport into the cell has taken place is released from the vehicle or can be detached by cellular systems.

30

The structure can comprise bifunctional, preferably heterologous bifunctional groups, the bifunctional groups preferably being selected from the substance group consisting of maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters. By this means, the release of the molecular substance is in particular achieved in the lysosome, in the cytoplasmic space or in the nucleus.



It has proven to be particularly expedient that the bifunctional groups react with cysteine residues on the capsomere. It is additionally regarded as advantageous that the interacting structure comprises affinity-increasing groups such as 4-iodoacetamidosalicylic acid and/or p-
5 arsonic acid phenyldiazonium fluoroborate and/or derivatives thereof. The structure can also be formed by epitopes of the VP1 pentamer.

According to a further embodiment of the invention, a
10 vehicle is provided where, using at least one further capsomere, it is possible to prepare a capsid-like structure for the transport of the molecular substance into a prespecified type of cells or to a prespecified site in the intracellular region. The further capsomere can be a
15 capsomere according to the invention. The capsid-like structure, however, can also be prepared using further capsomeres not according to the invention. The choice of the type of capsomeres and their combination for the preparation of the capsid-like structure depends on the
20 nature of the cell or on the prespecified location in the intracellular region, into which or to which the molecular substance is to be transported.

Expediently one side of the capsomere is part of the inside of the capsid-like structure, the capsid-like
25 structure preferably being derived from the polyoma virus. Finally, the capsid-like structure can comprise at least one VP-2 and/or VP-3 protein.



A development of the process according to the invention consists in modifying suitable residues of the capsomere, in particular its cysteine residues with bifunctional groups after step i) of the process of the invention. The modification can expediently be carried out using one or more of the following substances:

maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters.

The vehicle according to the invention can preferably be used as a pharmaceutical carrier for the administration of molecules such as DNA, RNA, oligonucleotides, PNA, proteins, peptides and of low molecular weight lipophilic and lipophobic reagents, of colloidal gold, gold-labeled proteins and peptides to eukaryotic cells.

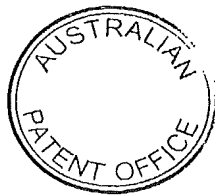
A combination of the vehicle with agents suitable or necessary for the administration, for example reagents, solvents and the like, is furthermore proposed. A combination of agents for carrying out the process according to the invention is likewise proposed. This combination can also include apparatus and the like.

The invention is described in greater detail with the aid of the following examples and illustrations.

Fig. 1 shows the gel electrophoretic detection of VP3, VP2 and VP1 fusion proteins,

Fig. 2 on the left shows an electron microscopic view of pentamers formed from the VP1 protein and on the right shows a computer-assisted illustration of the 5-fold symmetry of the pentamers,

Fig. 3 shows prepared pentamers and capsids formed



therefrom and

Fig. 4 shows an electron microscopic view of loaded VP1 capsids.

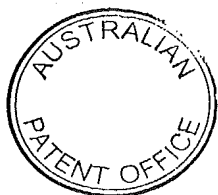
5

The following examples describe one possible embodiment of the invention.

- 1) Expression of the VP1 protein of polyoma virus in
10 E.coli:

A gene of the VP1 coat protein of the murine polyoma virus is taken which contains sequence features of both the strain A2 and the strain A3. The coding sequence
15 beginning with the ATG or the following amino acid is cloned immediately behind a factor Xa cleavage site in a derivative of the commercially available vector pQE 10 from Quiagen. This vector provides the fusion protein Xa cleavage site VP1 at the amino terminus with a histidine
20 sequence. The fusion construct thus obtained is cloned inside a marker gene (lacZ complementation) and is inducible via the lacZ promoter. The final construct is transformed in E. coli cells suitable for the expression of pQE vectors. When the cells, after prior culture, are
25 in the logarithmic phase, they are induced by addition of a suitable inductor, e.g. IPTG. After this, they express large amounts of a fusion protein containing the VP1 protein. The fusion protein is harvested after induction for 6 hours. It is present in soluble form and
30 can be prepared pure on nickel chelate columns with minor changes to the purification protocol of Quiagen. By incubation with factor Xa, the pure VP1 protein portion of the fusion protein can be removed again from the nickel chelate column. The VP1 protein obtained is
35 present in very pure form and forms pentamers by itself. The proteins VP2 and VP3 can be prepared analogously.

Fig. 1 shows the gel electrophoretic detection of the VP3, VP2 and VP1 fusion proteins. Shown in Fig. 2 are on



the left an electron microscopic view of pentamers formed from the VP1 protein and on the right a computer-assisted illustration of the 5-fold symmetry of the pentamers.

5

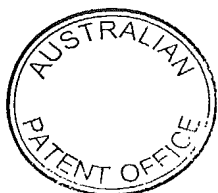
2) Modification of the cysteine residues on one side of the pentamers before their assembly:

The VP1 pentamers obtained according to 1 have a plurality of structures which can be converted into bifunctional groups by reaction with suitable reagents. The structures are found on the side of the pentamers [sic] which corresponds to its inside after assembly to give the capsid. The reagent used is a 3-maleimidobenzoyl-N-
10 hydroxysuccinimide ester dispersed in an acetone/methanol/water mixture, which on one side of the reactive center carries as reactive groups SH groups and on the other side a reactive ester group, namely an amino group-reactive succinimide ester. The dispersion
15 is mixed with the dissolved VP1 proteins so that a quantitative reaction takes place.

Shown in Table 1 are the loop structures of polyoma capsomeres which are to be found on one side of the
25 capsomeres and which after assembly point to the inside of the capsid or the capsid-like structure:

Table 1

30 Loop 1: Asp 38, Leu 39, Val 40, Thr 41, Gly 42, Pro 43, Asp 44, Ser 45
Loop 2: Asn 109, Glu 110, Asp 111, Leu 112, Thr 113, Lys 114, Asp 115, Thr 116, Leu 117
Tail: N-terminus of amino acid residue 1 to residue 29
35 (at least from the amino acid 18 of the N-terminus which is well localized in the structural analysis up to residue 29): Lys 18, Ala 19, Cys 20, Pro 21, Arg 22, Pro 23, Ala 24, Pro 25, Val 26, Pro 27, Lys 28, Leu 29



Loop 3: Tyr 354, Asp 355, Gly 356, Thr 357, Gln 358, Pro
359, Val 360

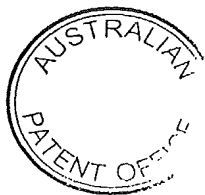
3) The assembly of VP1 pentamers to give VP1 capsids:

5

The VP1 pentamers are present in a buffer solution which contains EGTA to stabilize of the pentameric non-assembled state. Magnesium ions, sodium ions and tris/HCl, pH 7.6, are further added to the buffer solution to stabilize the pH. The protein solution is transferred to a dialysis chamber and dialyzed against a 2M ammonium sulfate solution. After several changes of the dialysis buffer, the VP1 pentamers form capsids. These do not differ from empty capsids of the polyoma virus on inspection in the electron microscope, in diameter, or in their stability, although they lack the inner coat proteins VP2 and VP3. Fig. 3 shows the pentamers prepared and capsids formed therefrom.

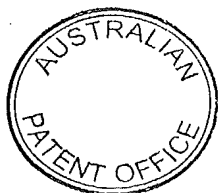
20 4) The packing of DNA oligonucleotides in polyoma VP1 capsids:

Conventional oligonucleotides, i.e. those unchanged in their chemical structure, can be packed into polyoma VP1 capsids in high yield according to the following protocol: capsid structures, such as have been obtained in Example 3, are buffered to pH 5.5. They are then reacted in an osmotic shock procedure with an equi- or higher molar amount, typically with a two-fold molar excess, of oligonucleotides. For the oligonucleotides used in this example (20-mers) a weight ratio of about 1:6 thus results compared with the VP1 protein. The form of the VP1 capsids loaded with oligonucleotides thus obtained cannot be differentiated in the electron microscope from the unloaded VP1 capsids. Fig. 4 shows an electron microscopic view of loaded VP1 capsids.



THE CLAIMS DEFINING THE INVENTION ARE AS FOLLOWS:

1. A process for the preparation of a vehicle with molecular substance, such as DNA, RNA, protein, PNA,
5 pharmaceuticals of lipophilic and lipophobic character, for transport into eukaryotic cells, comprising at least one capsomere derived or originating from a virus, which capsomere is formed such that it is suitable for the construction of a capsid or a capsid-like structure and on
10 one of its sides has a structure interacting with the molecular substance such that the molecular substance can be bound or added to the capsomere, and where said one side of the capsomere after assembly is a constituent of the inside of the capsid or capsid-like structure, comprising
15 the following steps:
i) synthesis, purification or isolation of the capsomere; and
ii) complexation of the molecular substance using the capsomere.
20
2. The process as claimed in claim 1, where the capsomere is derived from the polyoma virus.
3. The process as claimed in claim 2, where the capsomere
25 is formed from the VP1 pentamer of the polyoma virus or is derived therefrom.
4. The process as claimed in claim 1, where the capsomere is obtained from "non-enveloped" viruses such as DNA-
30 containing Papovaviridae, in particular polyoma and papilloma viruses, Iridoviridae, Ade-noviridae, Parvoviridae or RNA-containing Picor-naviridae, in



particular polio viruses, Caliciviridae, Reoviridae and Birnaviridae or is derived therefrom.

5 The process as claimed in claim 1, where the capsomere is obtained from the outer and/or inner coat of "enveloped" viruses such as DNA-containing Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae or RNA-containing Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendai viruses, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, 10 Flaviviridae, Rhabdoviridae and Filoviridae or is derived therefrom.

6. The process as claimed in one of the preceding claims, where the interactions are lipophilic interactions and/or 15 are based on covalent bonds, ionic bonds or hydrogen bridges.

7. The process as claimed in one of the preceding claims, where the interacting structure comprises bifunctional, 20 preferably heterologous bifunctional, groups.

8. The process as claimed in claim 7, where the bifunctional groups are selected from the substance group consisting of maleimide derivatives, alkyl halides, aryl 25 halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters.

9. The process as claimed in claim 7 or 8, where the bifunctional groups react with cysteine residues on the 30 capsomere.



10. The process as claimed in one of the preceding claims,
where the interacting structure comprises affinity-
increasing groups such as 4-iodoacetamidosalicylic acid
and/or p-arsonic acid phenyldiazonium fluoroborate and/or
5 derivatives thereof.

11. The process as claimed in one of claims 3 to 10, where
the interacting structure is formed by epitopes of the VP1
pentamer.

10

12. The process as claimed in one of the preceding claims,
where, using at least one further capsomere, it is possible
to prepare a capsid-like structure for the transport of the
molecular substance into a prespecified type of cells or to
15 a prespecified site in the intracellular region.

20

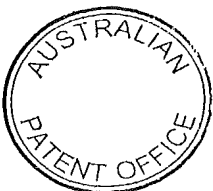
13. The process as claimed in one of the preceding claims,
where the capsid-like structure comprises at least one VP-2
and/or VP-3 protein.

25

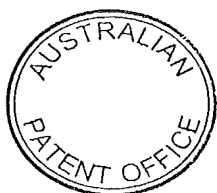
14. The process as claimed in one of the preceding claims,
where after step i) of claim 1 the suitable residues of the
capsomere, in particular its cysteine residues, are
modified with bifunctional groups.

30

15. The process as claimed in one of the preceding claims,
where the modification is carried out using one or more of
the following substances: maleimide derivatives, alkyl
halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes,
acrylating reagents and imidoesters.



16. The use of the vehicle prepared by the process as claimed in one of the preceding claims as a pharmaceutical carrier for the administration of molecules such as DNA, RNA, oligonucleotides, PNA, proteins, peptides and also
- 5 lower molecular weight lipophilic and lipophobic reagents, colloidal gold and gold-labeled proteins and peptides to eukaryotic cells.



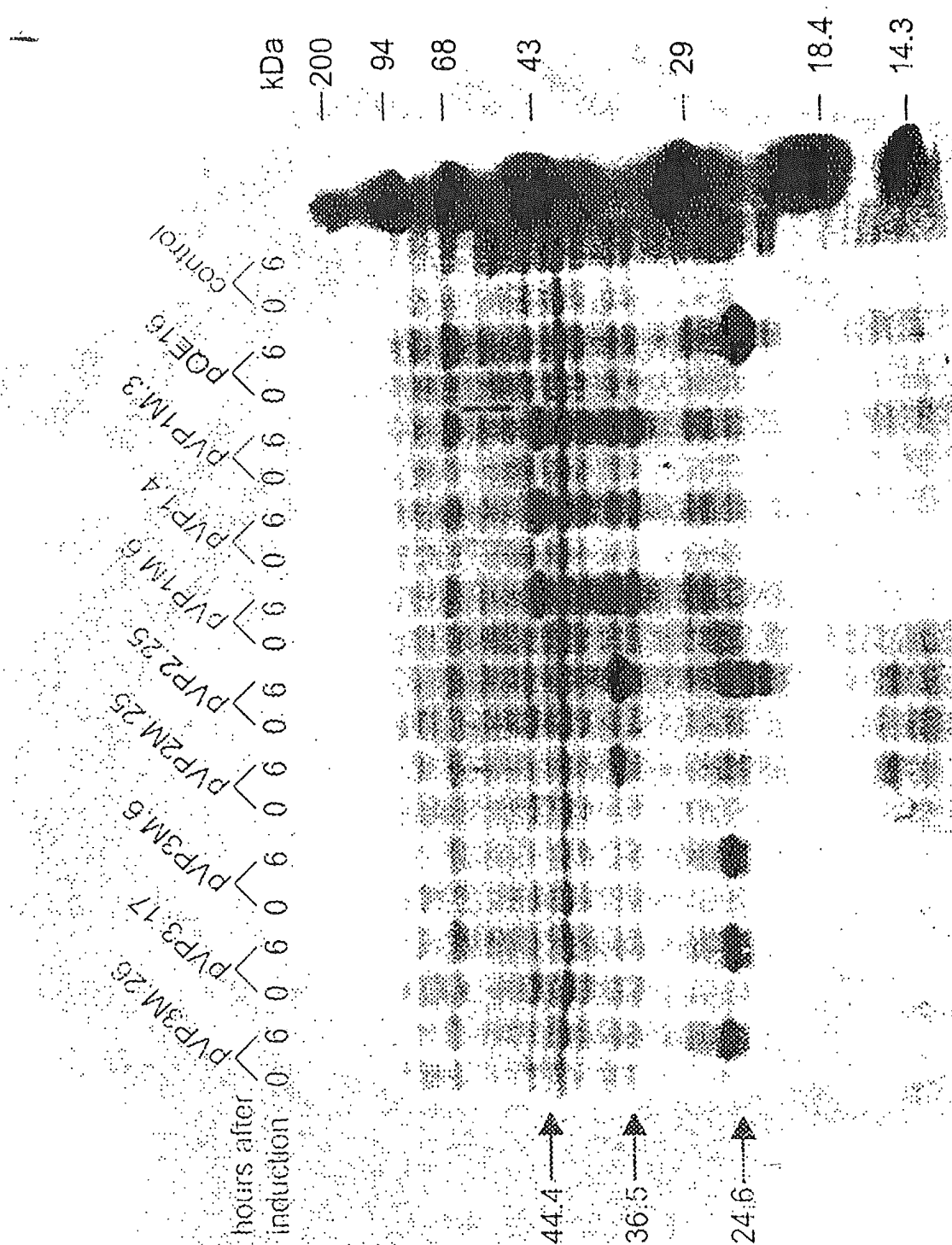


Fig. 1

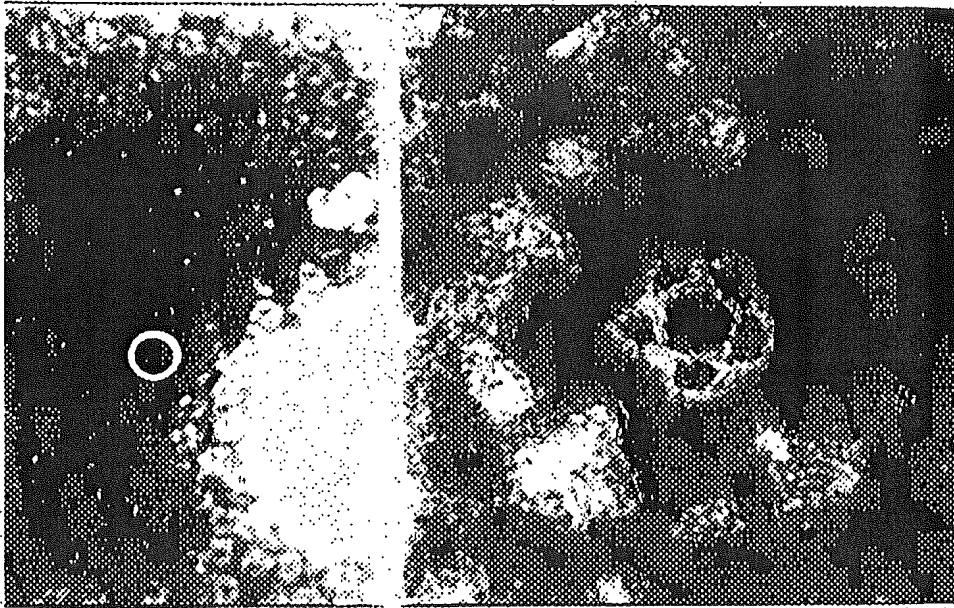


Fig. 2

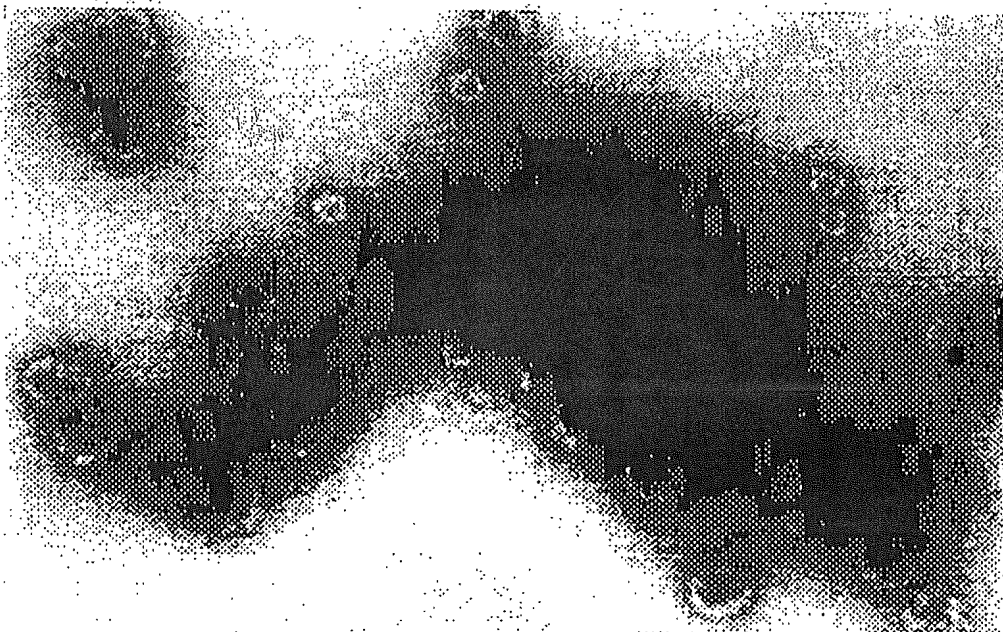


Fig. 4

3 / 3

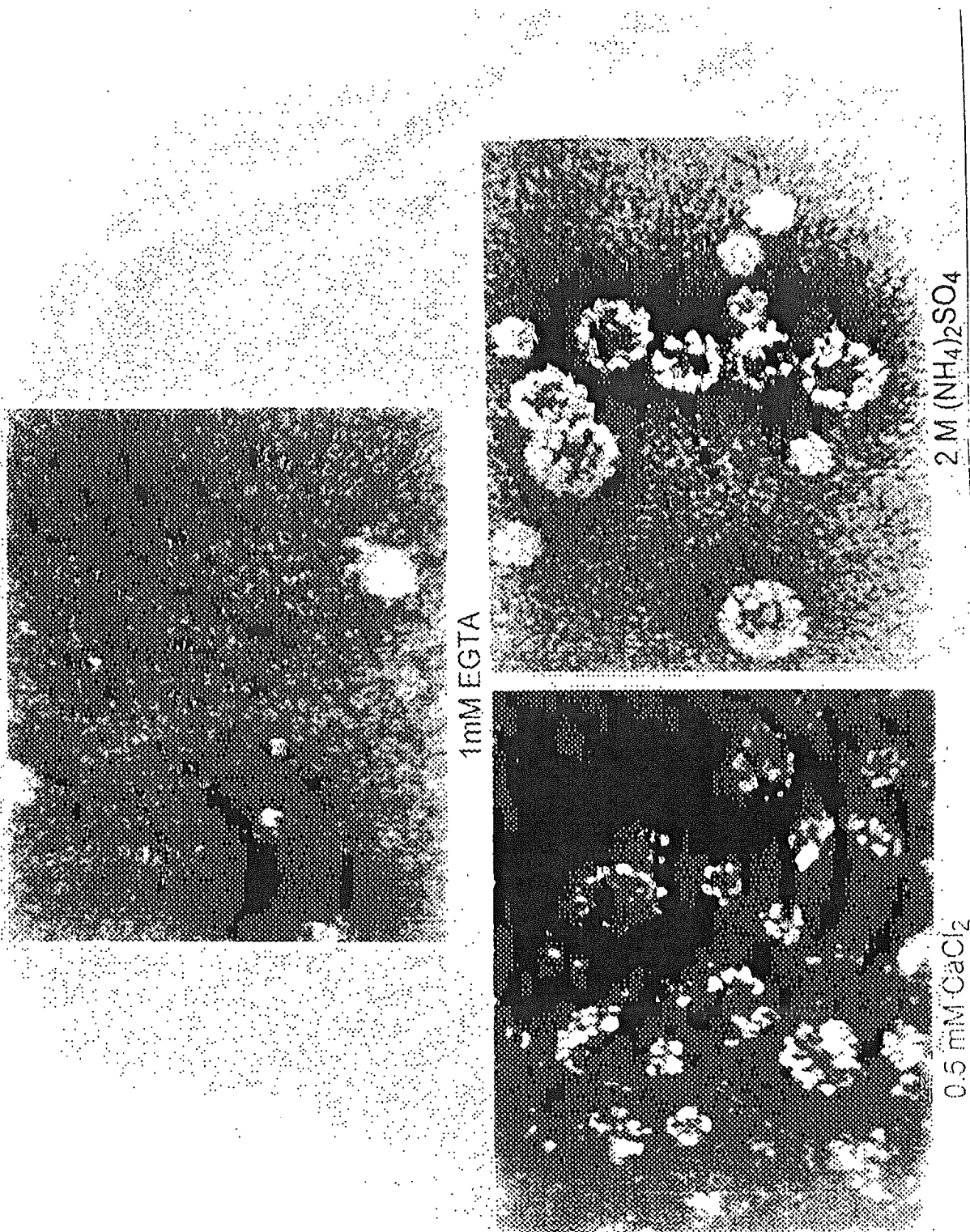


Fig. 3

Commonwealth of Australia


Patents Act 1990

IN THE MATTER of accepted
Australian Patent Application Serial No.
2005201044 by Alnylam Europe AG.

and

IN THE MATTER of Opposition
thereto by Sirna Therapeutics, Inc.

THIS IS Exhibit DKM-C referred to in the Statutory Declaration of David Keith Myers
made this second day of August, 2010.



Registered Patent Attorney

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/87, 15/86, A61K 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/43431 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00919 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Mai 1997 (07.05.97) (30) Prioritätsdaten: 196 18 797.4 10. Mai 1996 (10.05.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nürnberger Strasse 71, D-91052 Erlangen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, JP, KR, MX, SG, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: VEHICLE FOR THE TRANSPORT OF MOLECULAR SUBSTANCES		
(54) Bezeichnung: VEHIKEL ZUM TRANSPORT VON MOLEKULARER SUBSTANZ		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to a vehicle for the transport of molecular substances such as DNA, RNA, protein, PNA, pharmaceutical substances of lipophile and lipophobe character in eukaryotic cells comprising at least one capsomer derived from or originating from a virus that exhibits on its side a structure which interacts with the molecular substance so that the molecular substance can be bonded or become attached to the capsomer.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die Erfindung betrifft ein Vehikel zum Transport von molekularer Substanz wie DNA, RNA, Protein, PNA, Arzneistoffe lipophilen und lipophoben Charakters, in eukaryontische Zellen umfassend mindestens ein von einem Virus abgeleitetes oder stammendes Kapsomer, das an seiner einen Seite eine mit der molekularen Substanz in Wechselwirkungen tretende Struktur aufweist, so daß die molekulare Substanz an das Kapsomer bind- bzw. anlagerbar ist.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Vehikel zum Transport von molekularer Substanz

Die Erfindung betrifft ein Vehikel zum Transport von molekularer Substanz, wie DNA, RNA, Protein, PNA, Arzneistoffe lipophilen und lipophoben Charakters, in eukaryontische Zellen. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des Vehikels, dessen Verwendung sowie Zusammenstellungen von Mitteln zur Anwendung bzw. Durchführung der Erfindung.

Eukaryontische Zellen nehmen unter bestimmten Bedingungen DNA, Proteine und andere Moleküle auf. Die Aufnahmerate ist allerdings meist gering. Außerdem ist der Transport der molekularen Substanz in bezug auf die Art der Zellen sowie die Zellkompartimente oder den Ort im Intrazellulärbereich nicht vorherbestimmbar.

Um insbesondere die Aufnahme von DNA in eukaryontische Zellen zu verbessern, ist es bekannt, virale Vektoren als Vehikel zum Transport in die Zelle zu verwenden. - Die Verwendung viraler Vektoren ist nachteilig, weil es dabei zur Kotransfektion viraler Genome kommen kann.

Aus der US 4,950,599 ist des weiteren bekannt, molekulare Substanz wie DNA unter Verwendung leerer Viruskapside, insbesondere Polyomakapside, in eukaryontische Zellen zu schleusen. - Auch bei diesem Verfahren kann eine Kotransfektion viraler Genome nicht ausgeschlossen werden. Außerdem können Moleküle, deren Größe das Innenvolumen des Polyomakapsids übertreffen, darin nicht verpackt werden. Schließlich ist eine synthetische Herstellung von Polyomakapsiden, die als Möglichkeit der Vermeidung einer Kotransfektion in Betracht kommt, äußerst schwierig und kostenaufwendig.

35

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile des Stands der Technik zu beseitigen, insbesondere ein Vehikel zum Transport molekularer Substanz in eukaryontische Zellen anzugeben, das universell verwendbar sowie einfach und kostengünstig
5 herstellbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 16 und 19 - 21 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 15 sowie 17
10 und 18.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Vehikel vorgesehen, das mindestens ein von einem Virus abgeleitetes oder stammendes Kapsomer aufweist, das an seiner einen Seite eine mit der molekularen Substanz in Wechselwirkungen tretende Struktur auf-
15 weist, so daß die molekulare Substanz an das Kapsomer bind- bzw. anlagerbar ist.

Das erfindungsgemäße Vehikel hat den Vorteil, daß es relativ einfach synthetisch herstellbar ist. Somit kann eine Kotransfektion viraler Genome vermieden werden. Außerdem kann wegen des Vorsehens der mit der molekularen Substanz in Wechselwirkung tretenden Struktur molekulare Substanz jeglicher Größe gebunden und in Zellen geschleust werden. Dazu muß
20 die typische Kapsidform nicht mehr gewahrt werden. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vehikel bilden sich neben Kapsomeren auch andersartige schützende Formen aus. Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist darin zu sehen, daß es mit dem erfindungsgemäßen Vehikel je nach Ausbildung des
25 mindestens einen Kapsomers möglich ist, die molekulare Substanz spezifisch in bestimmte Zellen und/oder an einen vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich zu transportieren.

Das Kapsomer ist vorzugsweise so ausgebildet, daß es zum
35 Aufbau eines Kapsids oder eines kapsidartigen Gebildes geeig-

net ist. Von besonderem Vorteil ist es, wenn das Kapsomer spontan Kapside bildet.

5 Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal der Erfindung ist das Kapsomer vom Polyomavirus abgeleitet, wobei es aus dem VP1-Pentamer des Polyomavirus gebildet sein kann.

Alternativ dazu kann das Kapsomer aus "non-enveloped" Viren, wie DNA-haltigen Papovaviridae, insbesondere Polyoma- und den
10 Papillomaviren, Iridoviridae, Adenoviridae, Parvoviridae oder RNA-haltigen Picornaviridae, insbesondere Polioviren, Caliciviridae, Reoviridae und Birnaviridae, gewonnen oder davon abgeleitet sein. Je nach Art der zu transportierenden molekularen Substanz kann es auch von Vorteil sein, das
15 Kapsomer aus der äußeren und/oder inneren Hülle von "enveloped" Viren wie DNA-haltigen Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae oder RNA-haltigen Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendaviren, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae,
20 Rhabdoviridae und Filoviridae zu gewinnen oder davon abzuleiten.

Bei den Wechselwirkungen handelt es sich zweckmäßigerweise um lipophile Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen, die auf
25 kovalenten, ionischen oder Wasserstoffbrücken-Bindungen beruhen. Damit ist sichergestellt, daß die molekulare Substanz beim Transport in die Zelle sicher am Vehikel gebunden bzw. angehaftet bleibt, sich jedoch nach vollzogenem Transport in die Zelle vom Vehikel löst bzw. durch zelluläre
30 Systeme abgelöst werden kann.

Die Struktur kann bifunktionelle, vorzugsweise heterolog bifunktionelle Gruppen umfassen, wobei die bifunktionellen Gruppen vorzugsweise aus der Stoffgruppe der Maleinimid-
35 Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate,

Glutardialdehyde, acrylierenden Reagentien und Imidoester ausgewählt sind. Dadurch wird insbesondere die Abgabe der molekularen Substanz im Lysosom, im zytoplasmatischen Raum oder im Kern erreicht.

5

Als besonders zweckmäßig hat es sich erwiesen, daß die bifunktionellen Gruppen mit Cystein-Resten am Kapsomer reagieren. Als vorteilhaft wird des weiteren angesehen, daß die in Wechselwirkung tretende Struktur affinitätserhöhende Gruppen, wie 4-Iodoacetamido-salicylsäure und/oder p-Arsonsäure-phenyldiazonium-fluoroborat und/oder Derivate davon, umfaßt. - Die Struktur kann auch durch Epitope des VP1-Pentamers gebildet sein.

10

15 Nach einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung ist ein Vehikel vorgesehen, wobei mit mindestens einem weiteren Kapsomer ein kapsidartiges Gebilde zum Transport der molekularen Substanz in eine vorgegebene Art von Zellen oder an einen vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich herstellbar ist. Das weitere Kapsomer kann ein erfindungsgemäßes Kapsomer sein. Das kapsidartige Gebilde kann aber auch unter Verwendung nicht erfindungsgemäßer weiterer Kapsomere hergestellt werden. Die Wahl der Art der Kapsomere und deren Kombination zur Herstellung des kapsidartigen Gebildes hängt von der Art der Zelle bzw. vom vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich ab, in die bzw. an den die molekulare Sustanz transportiert werden soll.

20

25

Zweckmäßigerweise ist die eine Seite des Kapsomers Bestandteil der Innenseite des kapsidartigen Gebildes, wobei das kapisidartige Gebilde vorzugsweise vom Polyomavirus abgeleitet ist. Schließlich kann das kapsidartige Gebilde mindestens ein VP-2 und/oder VP-3 Protein umfassen.

30

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Vehikels ist ein die folgenden Schritte umfassendes Verfahren vorgesehen:

- 5 i) Synthetisieren, Aufreinigen oder Isolieren des Kapsomers und
- ii) Komplexieren der molekularen Substanz unter Verwendung des Kapsomers.
- 10 Eine Weiterbildung des Verfahrens besteht darin, nach dem Schritt lit.i geeignete Reste des Kapsomers, insbesondere dessen Cystein-Reste, mit bifunktionellen Gruppen zu modifizieren. Die Modifizierung kann zweckmäßigerweise unter Verwendung einer oder mehrerer der folgenden Stoffe durchge-
- 15 führt werden: Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate, Glutardialdehyde, acrylierende Reagenzien und Imidoester.

Das erfindungsgemäße Vehikel kann vorzugsweise als

20 Arzneistoffträger zur Applikation von Molekülen, wie DNA, RNA, Oligonukleotiden, PNA, Proteinen, Peptiden sowie von niedermolekularen lipophilen und lipophoben Reagenzien, von kolloidalem Gold, Gold-markierten Proteinen und Peptiden, in eukaryontische Zellen verwendet werden.

25 Nach Maßgabe der Erfindung ist ferner eine Zusammenstellung des erfindungsgemäßen Vehikels mit zur Applikation geeigneten oder notwendigen Mitteln, bsp. Reagentien, Lösungsmitteln u.ä., vorgesehen. Gleichfalls ist eine Zusammenstellung von

30 Mitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen. Diese Zusammenstellung kann auch Geräte u. dgl. umfassen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele und Darstellungen näher beschrieben. Es zeigen

5 Fig.1 den gelelektrophoretischen Nachweis der VP3, VP2 und VP1-Fusionsproteine,

10 Fig.2 links eine elektronenmikroskopische Ansicht von aus dem VP1-Protein gebildeten Pentameren und rechts eine computerunterstützte Darstellung der 5-fachen Symmetrie der Pentamere,

Fig.3 hergestellte Pentamere und daraus gebildete Kapside und

15 Fig.4 eine elektronenmikroskopische Ansicht beladener VP1-Kapside.

20 Die nachfolgenden Beispiele beschreiben eine mögliche Ausführung der Erfindung.

1) Expression des VP1-Proteins von Polyomavirus in E.coli:

25 Es wird ein Gen des VP1 Hüllproteins des murinen Polyomavirus hergenommen, das sowohl Sequenzmerkmale des Stammes A2 als auch des Stammes A3 aufweist. Die kodierende Sequenz beginnend mit dem ATG bzw. der darauf folgenden Aminosäure wird unmittelbar hinter einer Faktor Xa Schnittstelle in ein Derivat des kommerziell erhältlichen Vektors pQE 10 der Firma
30 Quiagen kloniert. Dieser Vektor versieht das Fusionsprotein Xa Schnittstelle-VP1 am Aminotermius mit einer Histidinabfolge. Das so gewonnene Fusionskonstrukt ist innerhalb eines Markergens (lacZ-Komplementation) kloniert und ist über den lacZ Promotor induzierbar. Das Endkonstrukt wird in
35 für die Expression von pQE-Vektoren geeignete E.coli Zellen

transformiert. Wenn die Zellen nach vorheriger Anzüchtung in der logarithmischen Phase sind, werden sie durch Zugabe eines geeigneten Induktors, bsp. IPTG, induziert. Sie exprimieren daraufhin große Mengen eines das VP1-Protein enthaltenden Fusionsproteins. Das Fusionsprotein wird nach 6-stündiger Induktion geerntet. Es liegt in löslicher Form vor und kann ohne größere Änderungen des Aufreinigungsprotokolls der Firma Quiagen über Nickelchelatsäulen rein dargestellt werden. Durch Inkubation mit Faktor Xa kann der reine VP1-Proteinanteil des Fusionsproteins von der Nickelchelatsäule wieder abgetrennt werden. Das erhaltene VP1-Protein liegt in sehr reiner Form vor und bildet von sich aus Pentamere. Analog können die Proteine VP2 und VP3 dargestellt werden.

Die Fig. 1 zeigt den gelelektrophoretischen Nachweis der VP3, VP2 und VP1-Fusionsproteine. Aus Fig. 2 ist links eine elektronenmikroskopische Ansicht von aus dem VP1-Protein gebildeten Pentameren und rechts eine computergestützte Darstellung der 5-fach Symmetrie der Pentamere ersichtlich.

20

2) Modifikation der Cystein-Reste an der einen Seite der Pentamere vor deren Assemblierung:

Die gemäß Ziffer 1 gewonnenen VP1-Pentamere besitzen mehrere Strukturen, die durch Reaktion mit geeigneten Reagenzien in bifunktionelle Gruppen umwandelbar sind. Die Strukturen befinden sich auf der Seite der Pentamere, die nach Assemblierung zum Kapsid dessen Innenseite entspricht. Als Reagenz wird ein in einer Aceton-Methanol-Wasser-Mischung dispergierter 3-Maleinimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester verwendet, der auf der einen Seite des Reaktionszentrums als reaktive Gruppen SH-Gruppen und auf der anderen Seite eine Reaktivestergruppe, nämlich einen aminogruppenreaktiven Succinimidester, trägt. Die Dispersion wird mit den gelösten

25

30

VP1-Proteinen gemischt, so daß eine quantitative Umsetzung erfolgt.

5 Aus Tabelle 1 sind die Loop-Strukturen von Polyomakapsomeren ersichtlich, die auf der einen Seite der Kapsomere zu finden sind, die nach der Assemblierung zur Innenseite des Kapsids bzw. der kapsidartigen Struktur weisen:

Tabelle 1

10 Loop 1: Asp 38, Leu 39, Val 40, Thr 41, Gly 42, Pro 43,
Asp 44, Ser 45
Loop 2: Asn 109, Glu 110, Asp 111, Leu 112, Thr 113, Lys 114,
Asp 115, Thr 116, Leu 117
Tail: N-Terminus von Aminosäurerest 1 bis Rest 29
15 (zumindest aber ab der in der Strukturanalyse gut lokalisierten Aminosäure 18 vom N-Terminus bis zu Rest 29): Lys 18, Ala 19, Cys 20, Pro 21, Arg 22, Pro 23, Ala 24, Pro 25, Val 26, Pro 27, Lys 28, Leu 29
Loop 3: Tyr 354, Asp 355, Gly 356, Thr 357, Gln 358, Pro 359, Val 360

20

3) Die Assemblierung von VP1-Pentameren zu VP1-Kapsiden:

Die VP1-Pentamere liegen in einer Pufferlösung vor, die EGTA zur Stabilisierung des pentameren nicht assemblierten
25 Zustands enthält. Ferner sind der Pufferlösung Magnesium-Ionen, Natrium-Ionen und Tris/HCl, pH 7,6, zur Stabilisierung des pH zugesetzt. Die Proteinlösung wird in eine Dialysekammer überführt und gegen eine 2M Ammoniumsulfatlösung dialysiert. Nach mehrfachem Wechsel des
30 Dialysepuffers bilden die VP1-Pentamere Kapside. Diese unterscheiden sich von leeren Kapsiden des Polyomavirus weder bei Betrachtung im Elektronenmikroskop noch im Durchmesser, noch in ihrer Stabilität, obwohl ihnen die inneren Hüllproteine

VP2 und VP3 fehlen. Fig. 3 zeigt die hergestellten Pentamere und daraus gebildete Kapside.

4) Die Verpackung von DNA Oligonukleotiden in Polyoma-VP1
5 Kapside:

Konventionelle, d.h. in ihrer chemischen Struktur nicht ver-
änderte Oligonukleotide, lassen sich nach folgendem Protokoll
mit hoher Ausbeute in Polyoma-VP1 Kapside verpacken:
10 Kapsidstrukturen, wie sie im Beispiel 3 gewonnen worden sind,
werden auf pH 5,5 umgepuffert. Anschließend werden sie in ei-
ner osmotischen Schockprozedur mit einer equi- oder höher mo-
laren Menge, typischerweise mit einem zweifachen molaren
Überschuß an Oligonukleotiden umgesetzt. Für die in diesem
15 Beispiel verwendeten Oligonukleotide (20-mere) ergibt sich
damit ein Gewichtsverhältnis von ca. 1:6 gegenüber dem VP1-
Protein. Die Form der so erhaltenen mit Oligonukleotiden be-
ladenen VP1-Kapside läßt sich im Elektronenmikroskop nicht
von der unbeladener VP1-Kapside unterscheiden. Fig. 4 zeigt
20 eine elektronenmikroskopische Ansicht beladener VP1-Kapside.

Patentansprüche

1. Vehikel zum Transport von molekularer Substanz wie DNA,
RNA, Protein, PNA, Arzneistoffe lipophilen und lipo-
phoben Charakters, in eukaryontische Zellen umfassend
mindestens ein von einem Virus abgeleitetes oder stam-
mendes Kapsomer, das an seiner einen Seite eine mit der
molekularen Substanz in Wechselwirkungen tretende
Struktur aufweist, so daß die molekulare Substanz an
das Kapsomer bind- bzw. anlagerbar ist.
2. Vehikel nach Anspruch 1, wobei das Kapsomer so ausge-
bildet ist, daß es zum Aufbau eines Kapsids oder eines
kapsidartigen Gebildes geeignet ist.
3. Vehikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Kapsomer vom
Polyomavirus abgeleitet ist.
4. Vehikel nach Anspruch 3, wobei das Kapsomer aus dem
VP1-Pentamer des Polyomavirus gebildet oder davon ab-
geleitet ist.
5. Vehikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Kapsomer aus
"non-enveloped" Viren wie DNA-haltigen Papovaviridae,
insbesondere Polyoma- und Papillomaviren, Iridoviridae,
Adenoviridae, Parvoviridae oder RNA-haltigen
Picornaviridae, insbesondere Polioviren, Caliciviridae,
Reoviridae und Birnaviridae gewonnen oder davon abge-
leitet ist.
6. Vehikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Kapsomer aus
der äußeren und/oder inneren Hülle von "enveloped"
Viren wie DNA-haltigen Poxviridae, Herpesviridae,
Hepadnaviridae oder RNA-haltigen Retroviridae,
Paramyxoviridae, Sendaiviren, Orthomyxoviridae,

Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae und Filoviridae gewonnen bzw. davon abgeleitet ist.

- 5 7. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Wechselwirkungen lipophile Wechselwirkungen sind und/oder auf kovalenten, ionischen oder Wasserstoffbrücken-Bindungen beruhen.
- 10 8. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die in Wechselwirkung tretende Struktur bifunktionelle, vorzugsweise heterolog bifunktionelle Gruppen, umfaßt.
- 15 9. Vehikel nach Anspruch 8, wobei die bifunktionellen Gruppen aus der Stoffgruppe der Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate, Glutardialdehyde, acrylierenden Reagenzien und Imidoester ausgewählt sind.
- 20 10. Vehikel nach Anspruch 8 oder 9, wobei die bifunktionellen Gruppen mit Cystein-Resten am Kapsomer reagieren.
- 25 11. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die in Wechselwirkung tretende Struktur affinitätserhöhende Gruppen, wie 4-Iodoacetamido-salicylsäure und/oder p-Arsonsäure-phenyldiazonium-fluoroborat und/oder Derivate davon, umfaßt.
- 30 12. Vehikel nach einem der Ansprüche 4 - 11, wobei die in Wechselwirkung tretende Struktur durch Epitope des VP1-Pentamers gebildet ist.
- 35 13. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mit mindestens einem weiteren Kapsomer ein kapsidartiges Gebilde zum Transport der molekularen Substanz in

eine vorgegebene Art von Zellen oder an einen vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich herstellbar ist.

14. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 die eine Seite des Kapsomers Bestandteil der Innenseite des kapsidartigen Gebildes ist.
15. Vehikel nach Anspruch 14, wobei das kapsidartige
10 Gebilde mindestens ein VP-2 und/oder VP-3 Protein umfaßt.
16. Verfahren zur Herstellung des Vehikels nach Anspruch 1, umfassend die folgenden Schritte:
- 15 i) Synthetisieren, Aufreinigen oder Isolieren des Kapsomers und
- ii) Komplexieren der molekularen Substanz unter
20 Verwendung des Kapsomers.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei nach dem Schritt
25 lit.i die geeigneten Reste des Kapsomers, insbesondere dessen Cystein-Reste, mit bifunktionellen Gruppen modifiziert werden.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Modifikation unter
30 Verwendung einer oder mehrerer der folgenden Stoffe durchgeführt wird: Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate, Glutardialdehyde, acrylierenden Reagentien und Imidoester.
19. Verwendung des Vehikels nach einem der vorhergehenden
35 Ansprüche 1 - 15 als Arzneistoffträger zur Applikation von Molekülen wie DNA, RNA, Oligonukleotiden, PNA, Proteinen, Peptiden sowie niedermolekularen lipophilen

und lipophoben Reagenzien, kolloidalem Gold und Goldmarkierten Proteinen und Peptiden in eukaryontische Zellen.

- 5 20. Zusammenstellung von Mitteln zur Applikation des Vehikels nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 - 15.
- 10 21. Zusammenstellung von Mitteln zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 16 - 18.

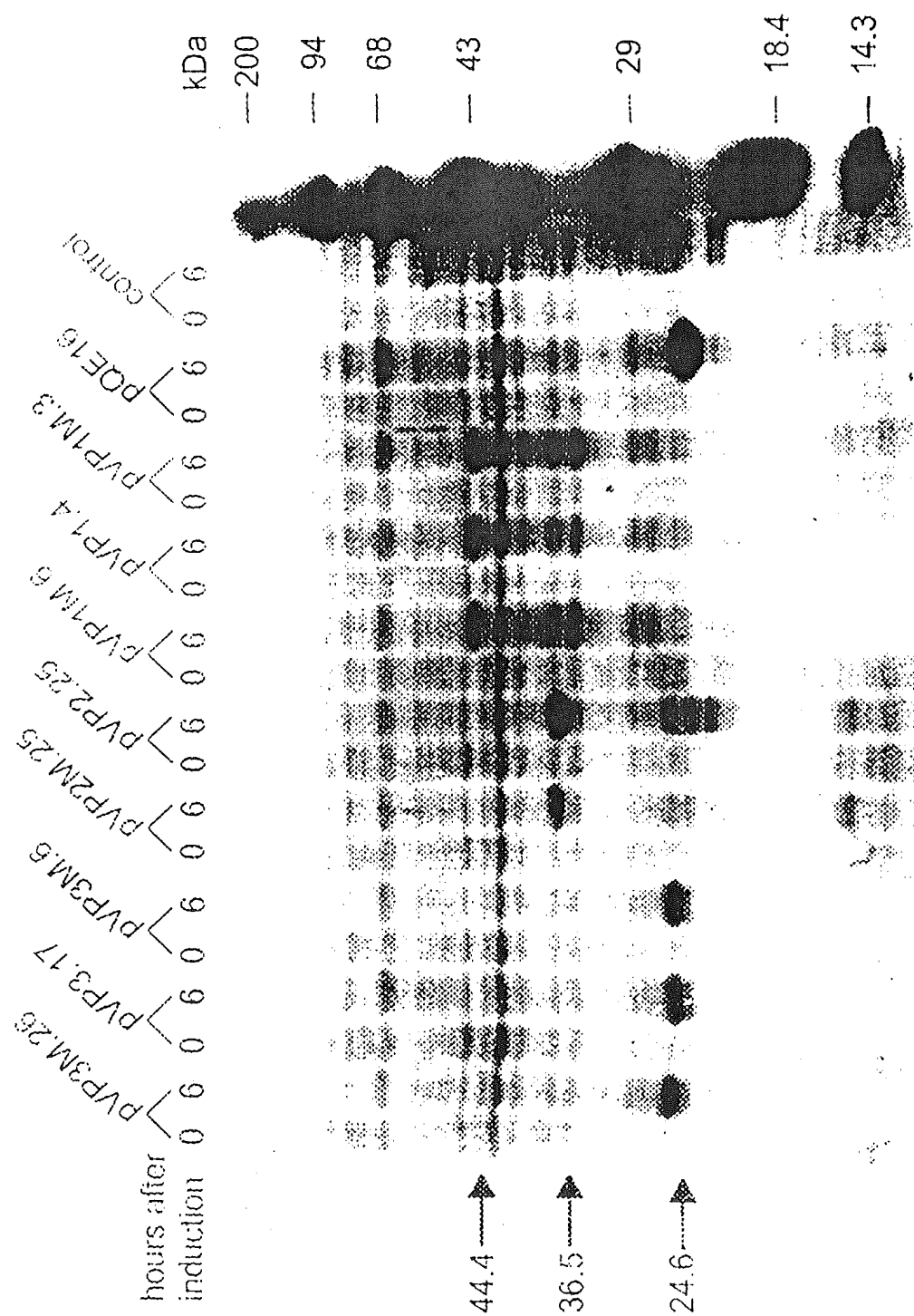


Fig. 1

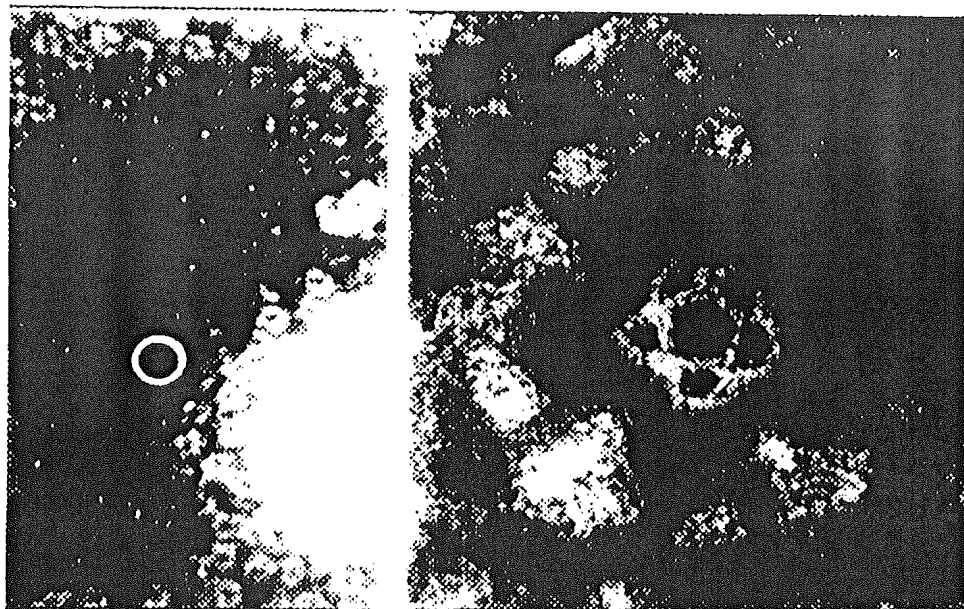


Fig. 2



Fig. 4

3 / 3

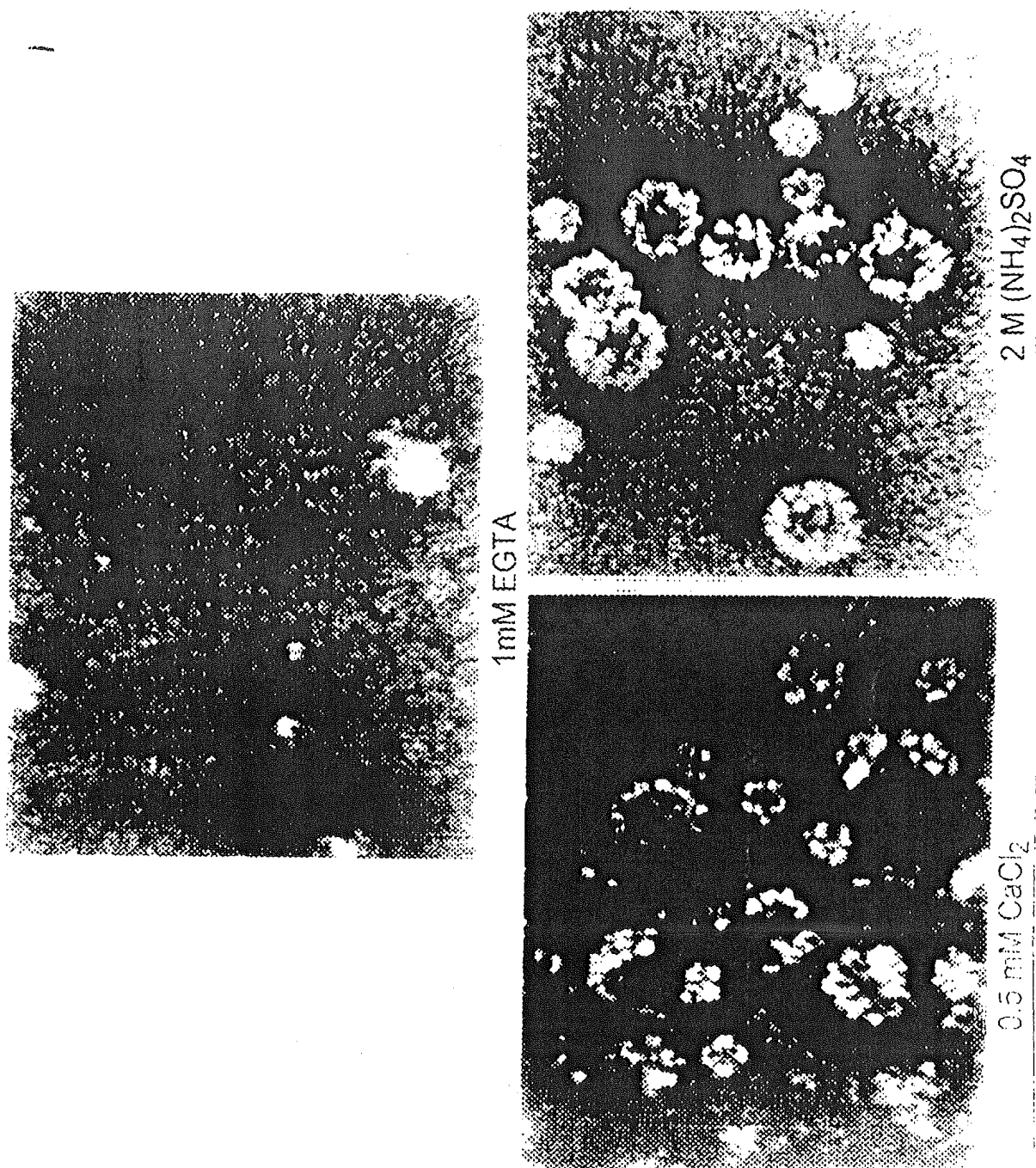


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/00919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/87 C12N15/86 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 257 431 A (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED) 13 January 1993	1,2, 7-11,13, 14,16-21
Y	see page 2, line 12 - page 3, line 29 see page 5, line 28 - page 6, line 10 ---	4,12,15
X	DE 43 35 025 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 20 April 1995 see page 3, line 15 - line 52 see page 3, line 63 - page 4, line 18 see page 4, line 32 - line 39 --- -/--	1-3,5, 7-10, 16-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 1997

Date of mailing of the international search report

16.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/00919

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 259 149 A (THE UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 9 March 1988 see page 3, line 13 - line 35 see page 4, line 30 - line 40 see page 7, line 37 - line 62 ---	1,2,7,8, 10,16, 17,19-21
X	MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 28, no. 3, 1991, pages 269-278, XP002040017 MARK J. REDMOND ET AL.: "Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins" see abstract see page 270, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 see page 271, left-hand column, paragraph 3 see page 271, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 see page 272, right-hand column, paragraph 1 - page 276, right-hand column, paragraph 3 ---	1,2,16, 19-21
Y	VIROLOGY, vol. 194, no. 1, May 1993, ORLANDO US, pages 393-398, XP002040018 SUE E. DELOS ET AL.: "Expression of the Polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: Coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization" see abstract ---	4,12,15
A	US 4 950 599 A (WOLF BERTLING) 21 August 1990 cited in the application see column 3, line 45 - column 4, line 24 see column 6, line 37 - column 7, line 4 see column 7, line 30 - line 59; example 2 -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/00919

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2257431 A	13-01-93	AU 657560 B	16-03-95
		AU 2195592 A	25-01-93
		CA 2111683 A	07-01-93
		EP 0591369 A	13-04-94
		WO 9300434 A	07-01-93
		JP 6509223 T	20-10-94
		NO 934842 A	28-02-94
		NZ 243330 A	27-06-94
DE 4335025 A	20-04-95	ZA 9204774 A	22-04-93
		AU 7812094 A	04-05-95
		WO 9510624 A	20-04-95
		EP 0724643 A	07-08-96
EP 259149 A	09-03-88	JP 9503665 T	15-04-97
		AU 608769 B	18-04-91
		AU 7791887 A	10-03-88
		CA 1319101 A	15-06-93
		DE 3788475 D	27-01-94
		DE 3788475 T	07-04-94
		DK 171602 B	17-02-97
		ES 2060603 T	01-12-94
		IE 61417 B	02-11-94
		JP 63218627 A	12-09-88
		US 5374426 A	20-12-94
US 4950599 A	21-08-90	US 5071651 A	10-12-91
		NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat es Aktenzeichen
PCT/DE 97/00919

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/87 C12N15/86 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB 2 257 431 A (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED) 13. Januar 1993	1,2, 7-11,13, 14,16-21
Y	siehe Seite 2, Zeile 12 - Seite 3, Zeile 29 siehe Seite 5, Zeile 28 - Seite 6, Zeile 10	4,12,15
X	DE 43 35 025 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 20. April 1995 siehe Seite 3, Zeile 15 - Zeile 52 siehe Seite 3, Zeile 63 - Seite 4, Zeile 18 siehe Seite 4, Zeile 32 - Zeile 39	1-3,5, 7-10, 16-21
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. September 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16. 09. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Montero Lopez, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 259 149 A (THE UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 9.März 1988 siehe Seite 3, Zeile 13 - Zeile 35 siehe Seite 4, Zeile 30 - Zeile 40 siehe Seite 7, Zeile 37 - Zeile 62 ---	1,2,7,8, 10,16, 17,19-21
X	MOLECULAR IMMUNOLOGY, Bd. 28, Nr. 3, 1991, Seiten 269-278, XP002040017 MARK J. REDMOND ET AL.: "Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins" siehe Zusammenfassung siehe Seite 270, rechte Spalte, Absatz 2 - Absatz 3 siehe Seite 271, linke Spalte, Absatz 3 siehe Seite 271, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 272, rechte Spalte, Absatz 1 - Seite 276, rechte Spalte, Absatz 3 ---	1,2,16, 19-21
Y	VIROLOGY, Bd. 194, Nr. 1, Mai 1993, ORLANDO US, Seiten 393-398, XP002040018 SUE E. DELOS ET AL.: "Expression of the Polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: Coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization" siehe Zusammenfassung ---	4,12,15
A	US 4 950 599 A (WOLF BERTLING) 21.August 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 3, Zeile 45 - Spalte 4, Zeile 24 siehe Spalte 6, Zeile 37 - Spalte 7, Zeile 4 siehe Spalte 7, Zeile 30 - Zeile 59; Beispiel 2 -----	1-21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00919

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2257431 A	13-01-93	AU 657560 B	16-03-95
		AU 2195592 A	25-01-93
		CA 2111683 A	07-01-93
		EP 0591369 A	13-04-94
		WO 9300434 A	07-01-93
		JP 6509223 T	20-10-94
		NO 934842 A	28-02-94
		NZ 243330 A	27-06-94
DE 4335025 A	20-04-95	ZA 9204774 A	22-04-93
		AU 7812094 A	04-05-95
		WO 9510624 A	20-04-95
		EP 0724643 A	07-08-96
EP 259149 A	09-03-88	JP 9503665 T	15-04-97
		AU 608769 B	18-04-91
		AU 7791887 A	10-03-88
		CA 1319101 A	15-06-93
		DE 3788475 D	27-01-94
		DE 3788475 T	07-04-94
		DK 171602 B	17-02-97
		ES 2060603 T	01-12-94
		IE 61417 B	02-11-94
		JP 63218627 A	12-09-88
		US 5374426 A	20-12-94
US 4950599 A	21-08-90	US 5071651 A	10-12-91
		KEINE	